

機関番号：82508

研究種目：新学術領域研究（研究課題提案型）

研究期間：H20 ～ H22

課題番号：20200062

研究課題名（和文）代謝物多様性解明に向けたマスフラグメンテーション解析法の開発

研究課題名（英文） Development of a new mass fragmentation analysis for understanding the diversity of metabolite

研究代表者

鈴木 秀幸（SUZUKI HIDEYUKI）

財団法人かずさ DNA 研究所・産業基盤開発研究部・主任研究員

研究者番号：80276162

研究成果の概要（和文）：生物が生合成する代謝物多様性を理解する上で、酸化反応に注目して3つの研究課題を遂行した。1）マメ科植物ミヤコグサ (*Lotus japonicus*) から新規のフラボノイド水酸化酵素遺伝子の機能解析を行った。2）同位体酸素 $^{18}\text{O}_2$ 存在下で生育したミヤコグサの代謝物アノテーションを行った。3）代謝物の網羅的 MS/MS フラグメント情報を用いて、ネットワーク解析を行い、簡易的な代謝物のグループ化に成功した。

研究成果の概要（英文）：In order to understand the diversity of metabolites produced by organisms, we have investigated three topical studies focused on oxidative reaction of metabolite. 1) We attempted to isolate a cDNA of flavonoid 8-hydroxylase from *Lotus japonicus*. This is the first identification of a flavonoid 8-hydroxylase cDNA from any plant species, and also this enzyme is a novel type of flavonoid hydroxylase. 2) We established a system to analyze metabolites found in *Lotus japonicus* that grows under oxygen-18 isotope and light conditions (16-h light/ 8-h dark cycles) at 22°C for four weeks. 3) We developed a comprehensive metabolite network system based on MS / MS fragmentation analysis to classify the structural group of metabolites.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
20年度	8,350,000	2,550,000	10,900,000
21年度	8,000,000	2,400,000	10,400,000
22年度	8,000,000	2,400,000	10,400,000
年度			
年度			
総計	24,350,000	7,350,000	31,700,000

研究分野：植物代謝工学

科研費の分科・細目：基礎生物学・植物分子生物学

キーワード：代謝物多様性、酸化反応、メタボロミクス、生物種間比較、進化、網羅的解析

1. 研究開始当初の背景

（1）生物の多様な代謝物は進化とともに構築された貴重な資源であり、食糧・薬・工業原材料として文明を支えている。よって代謝物多様性を生ずる仕組みの理解は生物学の大きな課題である。代謝物多様化過程で、ま

ず糖やアミノ酸等一次代謝物の環化・縮合から二次代謝物の骨格構造が形成された。次に酸素付加反応により骨格構造が豊かになると共に、引き続き修飾反応の足掛かりとなった。そして様々な修飾反応が起こることで膨大な多様性がもたらされた。これらを要約すると代謝物多様性は、酸化反応を鍵とした骨

格形成と、修飾反応との組み合わせとして捉える事ができる。

(2) 代謝産物の多様性をゲノム進化と関連して議論するためには、部分構造に基づき代謝物間の相関性を系統立てる必要がある。従来の研究では、特定の生物種の特定の代謝物について経路解析等がなされてきた。しかし、この方法では代謝物全体を系統立てることは難しい。

(3) そこで本研究では、網羅的部分構造分析に基づき代謝物を包括的に系統化し、生物種間で定量的比較をするための方法論開発を目的とした研究を提案した。

(4) 代謝物部分構造の分析に、質量分析装置でのマスフラグメンテーション (MS/MS) が有効な方法である。MS/MS シグナルからは部分構造の m/z 値実測が可能であり、フラグメントパターンの類似性・相違性から代謝物間の構造類似性を評価することができる。すなわち、MS/MS フラグメント解析により、部分構造に基づいた代謝物系統関係を解明できる。

(5) 本研究では、高分解能液体クロマトグラフィー質量分析装置を用いて代謝物の網羅的 MS/MS 分析を行ない、代謝物系統を解析する独創的手法を開発する。更に代謝物多様化の鍵反応である酸化反応の頻度解析を実施し、代謝物系統と統合的に解釈することで多様化の仕組みに迫る。これらの手法を大規模な代謝進化解析につなげるために、パイロット的に5種類のゲノム解読済み生物種の代謝物多様性解析を行ない、有効性を実証する。

(6) このように、代謝物多様化の鍵反応である酸化反応は重要にも関わらず、ゲノム解読されたモデル植物の酸化反応に関与する酵素遺伝子の機能解析に関して、未解明な酵素遺伝子が多く存在する。これら未知酵素遺伝子の機能解析には、オミックス (トランスクリプトーム及びメタボローム) 統合解析が有効であるので、本研究においても酸化反応に関与している酵素遺伝子の機能解析にオミックス解析を最大限に活用する。

2. 研究の目的

本研究は生物が生合成する代謝物多様性を理解する上で、酸化反応に注目して3つの研究課題 (同位体酸素環境下で生育した光合成生物の全代謝物の網羅的解析・ミヤコグサ由来フラボノイド 8-水酸化酵素遺伝子の単離と機能解析・代謝物 MS/MS フラグメンテー

ション情報を用いた代謝物ネットワーク解析) を遂行した。

(1) 同位体酸素環境下で生育した光合成生物の全代謝物の網羅的解析

光合成生物を中心とした5種のゲノム解読済み生物 (ラン藻・クラミドモナス・ヒメツリガネゴケ・シロイヌナズナ・ミヤコグサ) を実験材料として、全代謝物を対象にした同位体酸素原子取り込み分析を用いて、代謝物多様化の鍵反応と思われる酸化反応の発生頻度を解析する。確立された方法に基づき、方法の有効性を実証する。

(2) ミヤコグサ由来フラボノイド 8-水酸化酵素遺伝子の単離と機能解析

マメ科のミヤコグサはフラボノイド系黄色色素を花卉に蓄積する。その色素は広く植物に見られるフラボノールケルセチンの8位が水酸化された8-ヒドロキシケルセチン配糖体であることが明らかにされている。8位の水酸化については、キク科植物ではNADPH および FAD 依存性の膜結合酵素であるとされているが、遺伝子の単離は未だなされていない。本研究では、ゲノム解析が行われたミヤコグサを用いて、フラボノイド8位水酸化酵素遺伝子の単離と機能解析を行うことを目的とした。

(3) 代謝物 MS/MS フラグメンテーション情報を用いた代謝物ネットワーク解析

MS/MS フラグメントパターンには化学構造の特徴がよく現れることから、構造が類似した代謝物はお互いの MS/MS フラグメントパターンが類似すると予想される。そこで、質量分析装置で検出される膨大な代謝物のアノテーション作業に対して、MS/MS フラグメント情報を利用して簡易的なグループ分けを試みるシステムの開発を行う。

3. 研究の方法

(1) 同位体酸素環境下で生育した光合成生物の全代謝物の網羅的解析

短期間 (1 週間) 及び長期間 (4 週間)、同位体酸素環境下で生育 (22 度、16 時間明所 : 8 時間暗所) させたミヤコグサ地上部の全代謝産物分析を行った。

同位体酸素環境下で短期間 (1 週間) 及び長期間 (4 週間) 生育 (22 度、24 時間明所) させたヒメツリガネゴケ地上部の全代謝産物分析を行った。

同様な手法で、ラン藻、シロイヌナズナも代謝物分析を行った。

代謝物分析は全て、LC-Orbitrap-MS により網羅的に解析し、代謝産物に取り込まれた同位体酸素原子を中心に詳細な解析を行った。

(2) ミヤコグサ由来フラボノイド 8-水酸化酵素遺伝子の単離と機能解析

ミヤコグサの花弁および蕾由来の EST データを検索し、蕾のみで見られる配列の中から酸化酵素遺伝子に関連するクローンの選抜を行った。得られたクローンの中に、FAD 結合モチーフを有するモノオキシゲナーゼ様配列を見出し、この全長 cDNA を単離し、大腸菌および酵母細胞発現系を用いて機能解析を行った。

(3) 代謝物 MS/MS フラグメンテーション情報を用いた代謝物ネットワーク解析

精密質量分析機器 LC-FTICR-MS を用いたトマト (*Solanum lycopersicum* cv. Micro-Tom) のメタボローム解析により約 850 種類以上の代謝物アノテーション (注釈付け) を報告している。そこで、113 種類のフラボノイド標準品の MS/MS フラグメント情報とトマト由来の 850 種類の代謝物の MS/MS フラグメント情報に対して、コサイン相関係数を計算して、2 次元情報として互いの関係性をネットワーク描写した。

4. 研究成果

(1) 同位体酸素環境下で生育した光合成生物の全代謝物の網羅的解析

5 種のゲノム解読済み生物 (ラン藻・クラミドモナス・ヒメツリガネゴケ・シロイヌナズナ・ミヤコグサ) のうち、ミヤコグサを用いた長期間 (4 週間) のみで、主にフラボノイドの非糖部に同位体酸素原子が取り込まれたことを確認した (図 1)。MS/MS 分析による同位体酸素原子が取り込まれたフラボノイドの非糖部の詳細な部分構造解析を行った結果、フラボノイド骨格の B 環の水酸基に同位体酸素原子が取り込まれたことを明らかにした。この反応はシトクロム P450 の酵素 cinnamate-4-hydroxylase により、酸素原子が付加される反応であり、植物体を用いて、*in vivo* で酵素反応生成物を検出出来たことは、この同位体酸素原子が取り込み装置の実



図1 安定同位体酸素の投与および精密質量の取得

証を裏付ける証明がされ、今後、他の同位体酸素原子が取り込まれた代謝物の詳細な解析により、新たな酸化反応の発見及び酵素遺伝子の発見に繋がるものである。

(2) ミヤコグサ由来フラボノイド 8-水酸化酵素遺伝子の単離と機能解析

ミヤコグサを用いたメタボローム解析の結果 (図 2)、ミヤコグサの花弁の色素は広く植物に見られるフラボノールケルセチンの 8 位が水酸化された 8-ヒドロキシケルセチン配糖体であることが明らかになった。今回、単離された全長 cDNA を大腸菌および酵母細胞発現系を用いて機能解析を行った結果、ケルセチンを基質に用いた反応産物を LC/MS で分析したところ、反応産物の保持時間と質量電荷比および MS/MS フラグメントパターンは 8-ヒドロキシケルセチンと一致した。フラボノイド骨格の水酸化を行う酵素としてはシトクロム P450 や 2-オキシグルタル酸依存性ジオキシゲナーゼが報告されているが、今回同定した酵素はこれらとは異なる酵素群に属する新たなフラボノイド水酸化酵素である。また、本酵素の諸性質について解析を行った結果、本酵素フラバノン、ジヒドロフラボノール、フラボノール及びフラボンの 8 位に水酸化反応を触媒する酵素であることが示された。遺伝子の発現解析では、本酵素遺伝子は蕾の初期段階にのみ、発現していることが示された。ゲノム解析の結果、本酵素遺伝子は第 3 染色体上に 1 コピー存在して、イントロン 5 箇所とエクソン 6 箇所が存在することが分かった。フラボノイド骨格に直接水酸化反応を生じる酵素としては、初めてのフラビン依存性の酵素遺伝子の発見に至った。

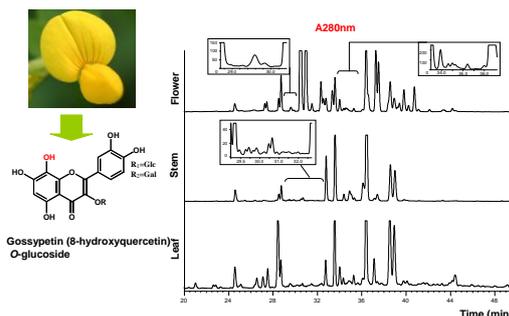


図2 ミヤコグサの比較メタボローム解析 (器官組織別)
花の色素 8-hydroxyquercetin は 3 位の配糖体として花弁に蓄積

(3) 代謝物 MS/MS フラグメンテーション情報を用いた代謝物ネットワーク解析

113 種類のフラボノイド標準品の MS/MS フラグメント情報とトマト由来の 850 種類の代謝物の MS/MS フラグメント情報に対して、コサイン相関係数を計算して、2 次元情報として互いの関係性をわかりやすくするために、閾値 0.5 でネットワークにて描写した (図 3)。

図3に示されるように、トマト由来の代謝産物は、フラボノイド標品とグルコアルカロイド標品のグループに容易に分離することができた。これは、多くの代謝産物の中から、グルコアルカロイド生合成経路を推測する上で注目すべき代謝物の情報を抽出できたことを意味する。これに続く精密質量値による化学組成式及びMS/MSフラグメント情報の差分解析により、 α -tomatine から esculeoside A の生合成中間体の検出及び生合成経路の推定に至った(図4)。

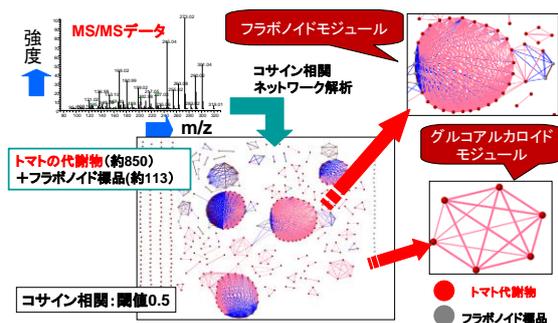


図3 トマト代謝物を用いたheuristicなMS/MSネットワーク解析
コサイン相関係数(閾値0.5)でネットワーク描画。赤丸●はトマト代謝物を示す。灰色●はフラボノイド標品を示す。赤線はトマト代謝物間のコサイン相関を示す。青線はトマト代謝物-フラボノイド標品のコサイン相関を示す。黒線はフラボノイド標品間のコサイン相関を示す。

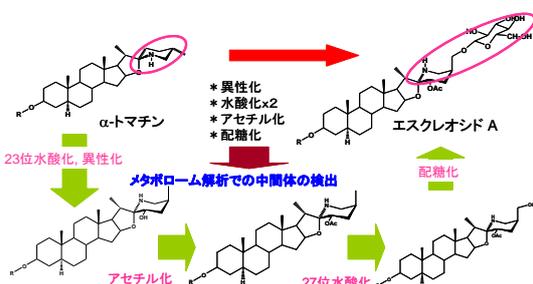


図4 トマト代謝物グリコアルカロイドの代謝経路の推定

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計0件)

[学会発表] (計2件)

①鈴木秀幸、嶋田典基、荒武、櫻井望、柴田大輔、青木考、同位体酸素環境下で生育した光合成生物の全代謝物の網羅的解析、第52回日本植物生理学会、平成23年3月22日、仙台

②嶋田典基、明石智義、青木俊夫、金森千奈、太田大策、青木考、柴田大輔、鈴木秀幸、ミヤコグサ由来フラボノイド 8-水酸化酵素遺伝子の単離と機能解析、第52回日本植物生理学会、平成23年3月21日、仙台

[図書] (計0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計1件)

名称: 「公開前につき非開示」

発明者: 鈴木秀幸

権利者: サントリー株式会社

種類: 特許

番号: 特願 2010-183875

出願年月日: 2010年8月19日

国内外の別: 国内

○取得状況 (計0件)

[その他]

ホームページ等 なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

鈴木 秀幸 (SUZUKI HIDEYUKI)

財団法人かずさ DNA 研究所・産業基盤開発研究部・主任研究員

研究者番号: 80276162

(2) 研究分担者

青木 考 (AOKI KOH)

財団法人かずさ DNA 研究所・室長

研究者番号: 30344021

嶋田典基 (SHIMADA NORIMOTO)

財団法人かずさ DNA 研究所・プロジェクト研究員

研究者番号: 30409081

(3) 連携研究者

尾形 善之 (OGATA YOSHIYUKI)

(独)理化学研究所植物科学研究センター・研究員

研究者番号: 90446542